

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
19. Juli 2001 (19.07.2001)

PCT

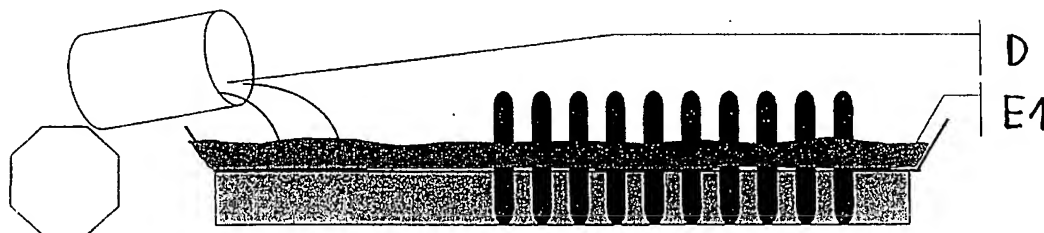
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/51910 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **G01N 1/36**
- (21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/DE00/04647**
- (22) Internationales Anmeldedatum:
22. Dezember 2000 (22.12.2000)
- (25) Einreichungssprache: **Deutsch**
- (26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**
- (30) Angaben zur Priorität:
100 01 136.5 13. Januar 2000 (13.01.2000) **DE**
- (71) Anmelder und
(72) Erfinder: **LILISCHKIS, Richard** [DE/DE]; Bahnriehe 38, 30179 Hannover (DE). **WASIELEWSKI, Reinhard** [DE/DE]; Eylauer Weg 11, 30657 Hannover (DE). **MEN-GEL, Michael** [DE/DE]; Brombergerstr. 17, 30659 Hannover (DE).
- (74) Anwalt: **LAMBSDORFF, Matthias**; Dingolfinger Strasse 6, 81673 München (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:**
— mit internationalem Recherchenbericht

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR PRODUCTION OF MATERIAL BLOCKS WITH MULTIPLE TEST SAMPLES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON MATERIALBLÖCKEN MIT MULTIPLN UNTERSUCHUNGSPROBEN



(57) Abstract: The invention relates to a method for the production of a material block containing several samples for testing, in particular, tissue samples. The method comprises firstly producing a material blank, preferably made from paraffin, which contains a number of openings for accommodating the corresponding tissue samples, whereby a material blank is formed with a regular arrangement of openings, by means of a suitably formed cast. Said openings extend from a first main surface of the material blank, in the direction of a second main surface, to a particular depth, preferably completely through. Said openings are finally charged with tissue samples, as cylindrical sample bores, and the above closely linked to the surrounding material of the material blank, by means of a temperature treatment step, preferably a double-melt procedure.

(57) Zusammenfassung: In einem Verfahren zur Herstellung eines Materialblocks enthaltend eine Mehrzahl von zu untersuchenden Proben, insbesondere Gewebeproben wird zuerst ein Materialrohling, vorzugsweise aus Paraffin, enthaltend eine Mehrzahl von Öffnungen für die Aufnahme entsprechender Gewebeproben hergestellt, wobei mittels einer geeignet ausgebildeten Gussform ein Materialrohling mit einer regelmässigen Anordnung von Öffnungen geformt wird, die sich ausgehend von einer ersten Hauptoberfläche des Materialrohlings in Richtung auf eine zweite Hauptoberfläche des Materialrohlings bis in eine bestimmte Tiefe, vorzugsweise durchgehend, erstrecken. Diese Öffnungen werden anschliessend mit Gewebeproben, wie Gewebestanzzyllindern beschickt und diese durch mindestens einen Temperaturbehandlungsschritt, vorzugsweise durch ein Doppel-Schmelz-Verfahren, innig mit dem sie umgebenden Material des Materialrohlings verbunden.



WO 01/51910 A1



- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Beschreibung:

Verfahren zur Herstellung von Materialblöcken mit multiplen Untersuchungsproben

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Materialrohlings enthaltend eine Mehrzahl von Öffnungen für die Aufnahme von zu untersuchenden Gewebeproben nach den Merkmalen des Patentanspruchs 1, ein Verfahren zur Herstellung eines Materialblocks enthaltend eine Mehrzahl von zu untersuchenden Gewebeproben nach den Merkmalen des Patentanspruchs 2, ein Verfahren zur Herstellung dünner Probenschnitte enthaltend eine Mehrzahl von zu untersuchenden Proben nach den Merkmalen des Patentanspruchs 3 und einen Materialrohling mit einer regelmäßigen Anordnung von Öffnungen für die Aufnahme von zu untersuchenden Proben gemäß den Merkmalen des Patentanspruchs 14.

Die vorliegende Erfindung liegt auf dem Gebiet der Untersuchung oder Bearbeitung von Gewebeproben, menschlicher, tierischer oder pflanzlicher Gewebe sowie von Mikroorganismen, Zellkulturen oder Makromolekülen in einer Matrix mit an sich im Stand der Technik bekannten Verfahren wie beispielsweise histologischen oder immunohistochemischen Untersuchungstechniken. Um eine Mehrzahl von Proben in vertretbarer Zeit untersuchen zu können, wurden im Stand der Technik verschiedene Verfahren zur Herstellung von Gewebeschnitten mit multiplen Gewebeproben entwickelt, mit denen diese Untersuchungen simultan durchgeführt werden können. Die simultane Untersuchung von multiplen Gewebeproben in einem Gewebeschnitt bietet zahlreiche Vorteile. Für die verschiedenen Untersuchungstechniken wie Histologie, Histochemie, Immunhistochemie, In-situ-Hybridisierung ist neben einer erheblichen Kosten- und Zeitersparnis gewährleistet, daß alle simultan untersuchten Pro-

ben unter identischen Labor- und Untersuchungsbedingungen getestet werden, was eine Qualitätskontrolle bzw. -sicherung der Untersuchungsergebnisse erlaubt. Für die Herstellung von Multi-Blöcken sollte das eingesetzte Verfahren die folgenden
5 Voraussetzungen erfüllen:

1. Nach der Einbettung der Gewebeproben muß eine Orientierung, z.B. Zuordnung der einzelnen Proben zu ihrem Ursprung möglich sein (welche Probe gehört zu welchem Patiententien).
10
2. Der Gewebeblock sollte für sämtliche Routinemethoden der Gewebebearbeitung (verschiedene Färbetechniken) geeignet sein und keiner gesonderten bzw. spezifischen Weiterverarbeitung nach der Herstellung mehr bedürfen (z.B. besondere Schneidetechnik).
15
3. Die Anwendung sollte mit geringem Arbeitsaufwand in kurzer Zeit ohne große Kosten möglich sein.
20
4. Die Gewebe- und Schnittqualität des Multi-Blocks sollte identisch zu der von Standardblöcken sein, die üblicherweise aus Paraffin hergestellt werden.
- 25 5. Die Gewebeproben sollten eine repräsentative Probengröße haben, um eine sichere Auswertung zu gewährleisten.
6. Die Gewebeproben sollten zur langfristigen Archivierung geeignet sein.
30

Im Stand der Technik sind bereits zahlreiche Verfahren zur Herstellung von Paraffinblöcken mit multiplen Gewebeproben beschrieben worden, die jeweils verschiedene Vor- und Nachteile bieten. Keines der zahlreichen Verfahren erlaubt jedoch

die Herstellung eines Paraffinblocks mit multiplen Gewebeproben, der anschließend wie ein gewöhnlicher Standard-Paraffinblock ohne Einschränkungen weiterverarbeitet werden kann und gleichzeitig einfach, kostengünstig und bei geringem Zeitaufwand hergestellt werden kann.

Die U.S.-PS 4,820,504 und U.S.-PS 5,002,377 beschreiben Verfahren, bei denen das Ausgangsgewebe zunächst deparaffiniert werden muß, um dann später in Form stabförmiger Gewebestücke wieder in Paraffin eingebettet zu werden. Diese Verfahren sind zum einen zeit- und arbeitsintensiv und zum anderen kann dazu in der Regel kein gewöhnliches Archivmaterial verwendet werden, da sich hieraus meistens keine stabförmigen Gewebestücke mehr gewinnen lassen, weil viele archivierte Gewebeproben dazu zu klein sind. Ferner müssen die aufwendig präparierten stabförmigen Gewebestücke vor der Wiedereinbettung in Paraffin zunächst in ein fragiles Medium (Agar) überführt werden und dabei in speziell gefertigte Haltevorrichtungen (Moles) eingebracht werden, damit später eine orientierende Einbettung in den Gewebeblock mit multiplen Gewebeproben möglich ist.

In der U.S.-PS 4,914,022 wird ein Verfahren beschrieben, bei dem aus archivierten Standard-Paraffinblöcken mittels einer Hohnadel Gewebestanzzylinder gewonnen werden, die dann mit einem Platzhalter (Strohhalme) in einen neuen Paraffinblock eingebettet werden. Dieses Verfahren bietet jedoch nur eine eingeschränkte Orientierung der multiplen Gewebestanzzylinder, da in einem Platzhalter mehrere (24 oder mehr) Gewebestanzzylinder zusammen eingebettet werden.

Ferner beschreiben Kononen et al. in "Nature Medicine 4:844-847", 1998, die Herstellung von Paraffinblöcken mit multiplen Gewebeproben durch eine technisch aufwendige Maschine, die

ebenfalls mittels einer Hohnadel Gewebestanzzylinder aus archivierten Standard-Paraffinblöcken gewinnt. Der Einsatz der Maschine erlaubt bei Verwendung sehr dünner Nadeln die Herstellung von Gewebeblocken mit einer großen Anzahl (bis 1000) von Gewebeproben, die orientiert in den Gewebeblock eingebracht werden können. Das Verfahren besitzt jedoch eine Reihe von Nachteilen:

- 10 - hohe Anschaffungskosten für die Maschine,
- die zeitgleiche Herstellung von mehreren Gewebeblocken mit multiplen Gewebeproben (kommerzielle Anwendung als Dienstleistung) setzt das Vorhandensein von mehreren Maschinen voraus,
- 15 - die große Anzahl der damit sehr kleinen Proben (500-600 μm Durchmesser) erfordert einen sehr präzisen und damit zeitaufwendigen Einsatz der Maschine. Ferner ist die Größe des auswertbaren Gewebes sehr klein und damit die
- 20 Beurteilbarkeit eingeschränkt.
- Die sehr dünnen Gewebestanzzylinder sind fragil und können daher praktisch nicht archiviert werden.
- 25 - Die gewonnenen Stanzen müssen in spezielles, weicheres Paraffin eingebracht werden. Der hergestellte Paraffinblock mit multiplen Gewebeproben kann dann nur unter Verwendung einer Spezialfolie geschnitten bzw. weiterverarbeitet werden. Diese Folie muß vor jedem Gewebeschnitt auf den Block aufgebracht werden, um ein sogenanntes Auseinanderschwimmen des Paraffinschnittes auf dem Wasserbad zu verhindern. Zusätzlich ist es nicht
- 30 möglich, dabei entsprechend dünne Schnittpräparate (8 μm statt normal 2-5 μm) anzufertigen, was die Beurteilbar-

keit verschiedener Färbeergebnisse erheblich einschränken kann.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung eines Materialblocks enthaltend eine Mehrzahl von zu untersuchenden Proben, insbesondere Gewebeproben anzugeben, durch welches sich mit geringem Arbeitsaufwand und verhältnismäßig kurzer Zeit ein derartiger Materialblock herstellen läßt. Gleichzeitig soll bezüglich der eingebetteten Gewebeproben eine Orientierung bzw. Zuordnung der einzelnen Proben zu ihrem Ursprung möglich sein. Die Qualität des Materialblocks sollte derart beschaffen sein, daß er für sämtliche Routinemethoden der Gewebeparbeitung geeignet ist und keiner gesonderten bzw. spezifischen Weiterverarbeitung nach der Herstellung mehr bedarf und die Gewebe- und Schnittqualität des Materialblocks identisch der von Standard-Paraffinblöcken ist. Ferner sollen die in dem Materialblock eingebetteten Gewebeproben eine repräsentative Probengröße haben, um eine sichere Auswertung zu gewährleisten, und die Gewebeproben sollten zur langfristigen Archivierung geeignet sein.

Diese Aufgaben werden durch die Merkmale der unabhängigen Patentansprüche gelöst. Demgemäß beschreibt die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines Materialrohlings enthaltend eine Mehrzahl von Öffnungen für die Aufnahme von zu untersuchenden Proben, bei welchem mittels einer geeignet ausgebildeten Gußform ein Materialrohling mit einer regelmäßigen Anordnung von Öffnungen geformt wird, die sich ausgehend von einer ersten Hauptoberfläche des Materialrohlings bis in eine bestimmte Tiefe in Richtung auf eine zweite Hauptoberfläche des Materialrohlings erstrecken.

Die Erfindung beschreibt weiterhin ein Verfahren zur Herstel-

lung eines Materialblocks enthaltend eine Mehrzahl von zu untersuchenden Proben, bei welchem

5 a) ein Materialrohling wie vorstehend beschrieben hergestellt wird, und

b) in mindestens einen Teil der vorhandenen Öffnungen des Materialrohlings zu untersuchende Proben eingebracht und mit dem umgebenden Material des Materialrohlings fest
10 verbunden werden.

Die Erfindung beschreibt ferner ein Verfahren zur Herstellung dünner Probenschnitte enthaltend eine Mehrzahl von zu untersuchenden Proben, bei welchem nach der Herstellung eines Materialblocks wie vorstehend beschrieben von einer seiner
15 Hauptoberflächen, an der die in ihn eingebrachten zu untersuchenden Proben nach außen freigelegt sind, Probenschnitte abgeschnitten werden.

20 Schließlich bezieht sich die Erfindung noch auf einen Materialrohling mit einer regelmäßigen Anordnung von Öffnungen für die Aufnahme von zu untersuchenden Proben, die sich ausgehend von einer ersten Hauptoberfläche des Materialrohlings in Richtung auf eine zweite Hauptoberfläche des Materialroh-
25 lings erstrecken.

In einer weiter unten noch im Detail beschriebenen Ausführungsart der Erfindung wird als Material für den Materialrohling Paraffin verwendet. Dabei werden die in den Materialroh-
30 ling geformten Öffnungen als Durchgangsöffnungen ausgebildet.

Die Erfindung umfaßt somit insbesondere ein neues, optimiertes Verfahren zur Herstellung von Materialblöcken mit multiplen Gewebeproben (Multi-Blöcken). Dieses Verfahren bietet al-

le Vorteile der bisher bekannten Verfahren und darüber hinaus werden deren Nachteile umgangen, so daß als Endprodukt ein Multi-Block entsteht, der wie ein Standard-Paraffinblock weiterverarbeitet werden kann.

5

Das hier vorgestellte Verfahren basiert vorzugsweise auf der Gewinnung von Gewebestanzzyllindern, die mit einer Hohlneedle aus in gewöhnlichem Paraffin eingebetteten Gewebeproben herausgestanzt werden. Anschließend werden diese Gewebestanzzyllinder zur orientierenden Einbettung in einen sogenannten Paraffinrohling eingebracht, der mittels der entsprechenden Gußform hergestellt wurde. Vorzugsweise entsteht dann durch ein Doppel-Schmelz-Verfahren aus einem Paraffinrohling mit multiplen Gewebestanzzyllindern ein homogener, stabiler Multi-Block, der normal geschnitten und mit allen gängigen Verfahren bearbeitet werden kann.

Als Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens sind insbesondere zu nennen:

20

1. Für die Gewinnung der Gewebestanzzyllinder können große, konventionelle Archive von Standard-Paraffinblöcken, z.B. in anatomischen oder pathologischen Instituten, genutzt werden. Auch relativ kleine archivierte Gewebeproben können als Ausgangsgewebe dienen. Ein Deparaffinieren und anschließendes Um- bzw. Wiedereinbetten des gewonnenen Gewebes ist nicht nötig, ebenso kein zwischenzeitliches Einbetten in Agar. Die Gewebestanzzyllinder können mit jeder Art von Hohlneedle (z.B. gewöhnliche medizinische Gewebebiopsienadeln) gewonnen werden. Der Durchmesser der Hohlneedle und damit der Gewebestanzzyllinder und damit entsprechend der beurteilbaren Gewebeprobe kann dabei variabel gewählt werden. Die Gewinnung der Gewebestanzzyllinder kann an jedem Ort ohne große

Vorkenntnis mit minimalem technischen Aufwand durchgeführt werden. Durch vorherige mikroskopische Inspektion eines konventionell (Hämatoxilin-Eosin) gefärbten Gewebeschnittes können aus den Archivblöcken gezielt Gewebestanzzylinder aus Gewebearealen, die von Interesse sind, gewonnen werden. Die gewonnenen Gewebestanzzylinder können selbst wiederum einfach und sicher archiviert werden.

2. Der mittels der Gußform hergestellte Materialrohling erlaubt die exakte orientierende Einbettung der Gewebestanzzylinder. Er besteht vorzugsweise aus homogenem Paraffin und enthält kein Fremdmaterial als Platzhalter, das bei der weiteren Bearbeitung des Blockes beeinträchtigend wirken könnte und ist ferner einfach, kostengünstig und rasch herzustellen. Er kann an jeden Ort versandt werden und dort mit im Durchmesser entsprechenden Gewebestanzzylindern bestückt werden und anschließend unter Anwendung des Doppel-Schmelz-Verfahrens zum Multi-Block vollendet werden. Damit ist die eigentliche Herstellung eines Multi-Blocks unabhängig von zusätzlichem technischem Gerät durchführbar, lediglich eine handelsübliche Pinzette erleichtert das Bestücken des Materialrohlings mit den Gewebestanzzylindern.

3. Als Gußform wird eine erstmals beschriebene Anordnung zur einfachen, kostengünstigen und raschen Herstellung von Materialrohlängen verwendet. Diese Gußform ist die Grundlage für die später entscheidende orientierende Einbettung der multiplen Gewebestanzzylinder. Sie ermöglicht die Herstellung des Materialrohlings zeitlich und räumlich unabhängig von der Gewinnung der Gewebestanzzylinder, der Bestückung der Materialrohlinge sowie von der Herstellung von Multi-Blöcken.

4. Ein vorzugsweise zur festen Verbindung zwischen den Gewebestanzzylindern und dem Materialrohling verwendetes Doppel-Schmelz-Verfahren ermöglicht die Herstellung eines homogenen, stabilen Gewebeblocks mit multiplen Gewebeproben, der ohne technische oder methodische Einschränkungen bzw. Zusätze weiterverarbeitet werden kann. Das gleichmäßige, zeitversetzte Erwärmen des mit multiplen Gewebestanzzylindern bestückten Materialrohlings von Unter- und Oberseite gewährleistet einerseits, daß die konstante Orientierung der Gewebestanzzylinder erhalten bleibt und gleichzeitig eine homogene Verschmelzung des Materials des Rohlings mit dem Material in den Gewebestanzzylindern, was dem fertigen Multi-Block eine hohe Stabilität verleiht. Das Verfahren ist ohne großen technischen Aufwand durchzuführen und damit in jedem Labor anwendbar.

Zusammengefaßt bietet die vorgestellte Erfindung die Möglichkeit, einerseits Gewebeblocks mit multiplen Gewebeproben als Dienstleistungen für andere Institutionen herzustellen, aber auch andererseits das technisch wenig aufwendige Verfahren komplett (z.B. in Form eines Baukastensystems) oder in Teilen (z.B. nur Materialrohlinge) an andere Institutionen abzugeben.

Eine wesentliche Anwendung derartiger Multi-Blöcke ist die schnelle und effektive Austestung und Charakterisierung von monoklonalen und polyklonalen Antikörpern bezüglich ihrer Spezifität und Sensitivität. Der Einsatz von monoklonalen und polyklonalen Antikörpern ist von großer Bedeutung für Diagnose, Charakterisierung, Stadieneinteilung und Therapieentscheidung in der modernen Pathologie sowie für zahlreiche wissenschaftliche Fragestellungen. Jedoch muß vor dem Einsatz

eines neuen Antikörpers seine Spezifität, also sein Reaktionsmuster mit normalem und pathologischem Gewebe, ausgetestet werden, was normalerweise mittels immunhistochemischer Techniken erfolgt. Dazu muß der entsprechende Antikörper mit

5 zahlreichen normalen und pathologischen Gewebearten ausgetestet werden, ein sehr zeit-, arbeits- und kostenintensives Vorgehen, das durch Multi-Blöcke erheblich verkürzt wird. Diese Vorgehensweise ist natürlich auf alle anderen, an Paraffinmaterial etablierten Untersuchungstechniken neben der

10 Immunhistochemie übertragbar, wie z.B. histochemische und biochemische Färbereaktionen und verschiedene Hybridisierungstechniken (In situ, fluorescence in situ hybridisation) (Fish), in situ-PCR, in situ Methylierungs-PCR). In all diesen Labortechniken bedeutet der Einsatz von Multi-Blöcken vor

15 allem eine Zeit- und Kostenersparnis und die Bereitstellung identischer Laborbedingungen, die damit auch eine Beschleunigung in der Bearbeitung von wissenschaftlichen Fragestellungen erlaubt. Ebenso können wissenschaftliche Untersuchungen an großen Patientenkollektiven schneller und kostengünstiger

20 durchgeführt und ausgewertet werden.

Das beschriebene Verfahren ist dabei nicht auf die Untersuchung von menschlichem Gewebe beschränkt. Tierische und pflanzliche Gewebe können ebenso wie Mikroorganismen und kultivierte Zellen sowie Makromoleküle in einer Matrixgrundlage

25 schneller und kostengünstiger untersucht werden.

Ein weiterer, immer mehr an Bedeutung gewinnender Vorteil dieser Technik ist die verbesserte Qualitätskontrolle und

30 gleichzeitige Qualitätssicherung, die diesem Verfahren inherent ist. Da alle Proben unter identischen Labor- und Testbedingungen simultan untersucht werden, sind falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse rasch zu erkennen. Der Einsatz von exakt charakterisierten Zellkulturen in Form von Multi-

Blöcken mit multiplen verschiedenen Zellkulturen kann dabei vor allem in der mittlerweile zum diagnostischen Routineverfahren gewordenen Immunhistochemie wesentlich zur Qualitätssicherung und möglicherweise auch zur Quantifizierung der Ergebnisse beitragen.

Zusammengefaßt bietet die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur einfachen, raschen, flexiblen, kostengünstigen und zuverlässigen Herstellung von Gewebeblocks mit multiplen Gewebeproben, die die simultane Untersuchung multipler verschiedener menschlicher, tierischer oder pflanzlicher Gewebe sowie von Mikroorganismen oder Zellkulturen mit allen bekannten, an Paraffin eingebetteten Geweben etablierten Untersuchungstechniken ohne technische oder methodische Zusätze bzw. Einschränkungen erlaubt.

Im folgenden wird eine einzige Ausführungsart der vorliegenden Erfindung anhand der Zeichnungen näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1a-c die Einzelteile einer Gußform für den Materialrohling;

Fig. 2a,b die Herstellung eines Materialrohlings mittels der Gußform;

Fig. 3a,b das Einbringen von Gewebeproben in den Materialrohling;

Fig. 4a,b die feste Verbindung der Gewebeproben mit dem Materialrohling durch Temperaturbehandlungsschritte;

Fig. 5a-c das Aufbringen einer Einbettkassette auf den Materialblock und das nachfolgende Befüllen der Ein-

bettkassette mit weiterem, härtbarem Material und das nachfolgende Entfernen einer Einbettschale;

Fig. 6a,b der fertiggestellte, durch die Einbettkassette gehaltene Materialblock in einer Seitenansicht und einer Draufsicht mit einer zur Orientierung dienenden Gewebeprobe.

Die Grundlage der Herstellung von Multi-Blöcken ist die Produktion eines Materialrohlings, insbesondere eines Paraffinrohling, in den später die Gewebeproben, insbesondere Gewebestanzzylinder, eingebracht werden können. Dieser Paraffinrohling hat die Größe von ca. 40 x 25 mm und ist damit kompatibel mit herkömmlichen Paraffinblöcken. Daher kann der fertige Multi-Block ohne spezielle Hilfsmittel oder -techniken in Routinelaboratorien geschnitten und weiterbearbeitet werden.

Die Paraffinrohlinge werden in einer speziellen Gußform in Direktgußtechnik hergestellt. Die Zusammenstellung der Gußform ist in den Fig. 1a-c dargestellt, wobei die fertiggestellte Gußform in der Fig. 1c gezeigt ist. Die Gußform besteht z.B. aus einem Aluminiumblock B, in den beispielsweise zwischen 60 bis zu 120 Zylinderstifte A (zapfenförmige Elemente) mit einem Durchmesser von z.B. 1,5 mm (DIN7) mittels vorgebohrter Löcher eingetrieben worden sind. Die Zylinderstifte sind parallel zueinander angeordnet und sitzen unverrückbar fest in dem Aluminiumblock. Der Aluminiumblock weist beispielsweise eine Kantenlänge von 40 x 28 mm und eine Höhe von 11 mm auf. In diesen Block werden beispielsweise 96 Löcher mit 1,5 mm Durchmesser gebohrt. In alle 96 Löcher werden bündig 96 spezialgehärtete Zylinderstifte von 1,5 mm Durchmesser und 20^a mm Länge eingeschlagen. In Fig. 1a ist ein entsprechendes Zwischenprodukt in einem Querschnitt durch eine

Ebene einer Stiftreihe dargestellt.

Eine weitere Ausführungsform der Gußform besteht aus einer Aluminiumplatte, in die nach oben beschriebener Art beliebig
5 viele Löcher gebohrt und Zylinderstifte eingetrieben wurden. Auf die Aluminiumplatte wird anstelle der vorgebohrten Einbettschale eine zum Beispiel 2-5 mm dicke Platte aus V2A Stahl mit paßgenauen Löchern von zum Beispiel 1,6 mm Durchmesser gesetzt, die am Rand zum Beispiel 5 mm erhöht ist. Mit
10 dieser Anordnung kann ein Mehrfachrohling hergestellt werden, von dem Stücke mit der benötigten Lochanzahl abgetrennt und die wie Einfachrohlinge weiterverarbeitet werden können.

Gemäß Fig. 1b ist eine Einbettschale C, wie sie üblicherweise
15 in einem histologischen Labor zum Paraffinausgießen von Geweblöcken benutzt wird, mit korrespondierenden Bohrungen modifiziert worden, so daß sie über die Zylinderstifte der Gußform direkt auf den Aluminiumblock aufgesetzt werden kann und schlüssig auf diesem aufliegt (s. Fig. 1c). Es kann bei-
20 spielsweise eine handelsübliche Einbettschale von 37 x 24 x 5 mm verwendet werden, die durch zentrisch in die Vertiefung gebohrte Löcher modifiziert wurde. Es sind so z.B. 96 Löcher mit 1,6 mm Durchmesser in regelmäßiger 8 x 12-Anordnung gebohrt worden. Der Abstand der Lochmittelpunkte einer Reihe
25 beträgt 1,9 mm, so daß alle Bohrungen in einem Feld von 14,9 x 22,5 mm resultieren.

In gleicher Weise können auch Gußformen mit anderen Loch- und Zylinderstiftanzahlen, wie z.B. 60 in 6 x 10-Anordnung oder
30 24 in 4 x 6-Anordnung, verwendet werden. Weiterhin kann auch der Durchmesser der Zylinderstifte und der Löcher in der modifizierten Einbettschale variiert werden.

Gemäß Fig. 1c wird die modifizierte Einbettschale derart auf

den Aluminiumblock gesteckt, daß die konvexe Seite der modifizierten Einbettschale auf dem Aluminiumblock flächig aufliegt. Auf der konkaven Seite der Schale zeigen die durch sie gesteckten Zylinderstifte dabei senkrecht nach oben.

5

In den Fig. 2a, b wird nun beschrieben, wie der Materialrohling hergestellt wird. Zu diesem Zweck wird die Gußform der Fig. 1c auf einer regulierbaren Heizplatte auf ca. 65° vorgewärmt. In diese Anordnung werden ca. 3,5 ml auf 70° erwärmtes

10 Paraffin D in die modifizierte Einbettschale eingegossen, so daß es auch zwischen die Zylinderstifte fließt. Eine ausreichende Anfangstemperatur ist dabei notwendig, bzw. ein leichtes Vorwärmen der Zylinderstifte, damit es nicht zu einer zu raschen Abkühlung und damit Erhärtung des Paraffins kommt.

15 Anschließend wird der Rohling E1 durch langsames Abkühlen auf Raumtemperatur verfestigt.

Ist der Paraffinrohling E2 vollständig erhärtet, wird der Aluminiumblock B erneut vorsichtig leicht erwärmt (< 40°C,

20 damit der Schmelzpunkt von handelsüblichem Paraffin von 56°C nicht überschritten wird), um das Abziehen der modifizierten Einbettschale C einschließlich des Paraffinrohlings E2 zu erleichtern. Wie in Fig. 3a gezeigt, wird durch anschließendes Kühlen (4°C) und vorsichtiges Beklopfen der Paraffinrohling

25 E2 aus der modifizierten Einbettschale herausgelöst. Die so hergestellten Paraffinrohlinge können bei Raumtemperatur ohne zeitliche Begrenzung gelagert werden. Sie können somit auf Vorrat hergestellt und gegebenenfalls verschickt werden.

30 In Fig. 3b ist dargestellt, wie in den Paraffinrohling Gewebeproben, insbesondere Gewebestanzzylinder F, eingebracht werden, wobei der Rohling in eine konventionelle Einbettschale G zur besseren Handhabung gelegt wird. Dadurch ist auch gewährleistet, daß keine Gewebestanzzylinder beim Einschieben

von oben durch den Paraffinrohling durchfallen können und verlorengehen.

In die auf die oben beschriebene Weise präformierten Hohlräume des Paraffinrohlings werden Gewebestanzzylinder von 1,5 mm Durchmesser und 3-8 mm Länge eingebracht und diese zu einem einheitlichen Multi-Block verschmolzen. Zur Herstellung dieser Gewebestanzzylinder werden eine Hohlneedle sowie ein paßgenauer Stempel benötigt. Hohlneedle und Stempel werden beispielsweise aus herkömmlichen Biopsienadeln gefertigt, wie sie in der klinischen Gewinnung von Gewebebiopsien verwendet werden. Die Biopsienadel wird abgelängt, plangeschliffen und die äußere Kante der Hohlneedle angeschliffen. Mit Hilfe der so hergestellten Hohlneedle werden mit der Hand Zylinder von 3-8 mm Länge aus Paraffinblöcken gestochen und die Gewebestanzzylinder mit dem Stempel aus der Hohlneedle ausgetrieben. Es können alle in Paraffin eingebetteten Untersuchungsobjekte gestanzt werden, z.B. Gewebe, eingebettete Zellen menschlichen, tierischen oder pflanzlichen Ursprungs, Mikroorganismen, virusinfizierte Zellen, Makromoleküle auf Trägermatrix und andere Partikel, etc. Die Stanzzylinder können z.B. in Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei Raumtemperatur zeitlich unbegrenzt gelagert werden, was die Zusammenstellung von Stanzbibliotheken ermöglicht und das gleichzeitige Bereithalten aller Gewebestanzblöcke unnötig macht.

Gemäß Fig. 3b werden für einen Multi-Block z.B. 96 verschiedene Gewebestanzzylinder F sowie ein Paraffinrohling, wie oben angegeben, hergestellt. Weiterhin wird eine konventionelle Einbettschale G ohne Modifikationen benötigt, die also keine Löcher aufweist.

Der Paraffinrohling wird dabei paßgenau in eine konventionelle Einbettschale G gelegt und mindestens ein Teil der Öffnung

gen wird mit Gewebestanzzylindern F beschickt. Bei diesem Vorgang sollte darauf geachtet werden, daß der Gewebestanzzylinder mit der glatten Seite, d.h. mit der Schnittfläche des Original-Paraffinblocks voran in den Paraffinrohling gesteckt wird, damit das zu untersuchende Gewebe auch im fertigen Multi-Block direkt angeschnitten wird. An exzentrischer Stelle (z.B. in einem 96er Block erste Reihe, dritter Hohlraum von rechts) wird ein Gewebestanzzylinder mit artfremdem Gewebe eingebracht, der sich vom Untersuchungsgut stark unterscheidet und deshalb eine einfache Orientierung des Schnittes auf dem Objektträger zuläßt. Sind alle Hohlräume des Paraffinrohlings mit Gewebestanzzylindern bestückt, wird der Rohling mit den Gewebestanzzylindern zu einem einheitlichen Paraffinblock verschmolzen, der sich in seinen technischen Eigenschaften nicht von einem Paraffinblock mit nur einer Gewebeprobe unterscheidet.

Dieser Vorgang des Verschmelzens ist in den Fig. 4a, b dargestellt. Die Einbettschale G mit dem durch Gewebestanzzylinder gefüllten Paraffinrohling wird vorzugsweise in einem Doppel-Schmelz-Verfahren zu einem homogenen Paraffinblock eingeschmolzen. Essentiell bei diesem Vorgang ist die Tatsache, daß das Doppel-Schmelz-Verfahren die originale Geometrie des Blockes erhält, d.h. die Gewebestanzzylinder während des Schmelzvorganges nicht umfallen oder anderweitig die originale Position verändern, was eine Zuordnung der Gewebeproben im Schnitt unmöglich machen würde. Der bestückte Paraffinrohling wird in der konventionellen Einbettschale auf eine regulierbare Heizplatte, wie eine Thermoplatte oder der Block einer PCR-Maschine, gelegt. Das Doppel-Schmelz-Verfahren beginnt mit langsamem Erhitzen von unten, solange bis über 50 % der Dicke des Paraffinblockes (aber nicht mehr als 80 %) sich verflüssigt haben (H1). Vorzugsweise wird dabei der bestückte Paraffinrohling für 10-20 Minuten auf 40°C vorgewärmt. Mit

einem ein- bis mehrminütigen Impuls von 70 (max. 80) °C, dessen Länge im wesentlichen von der Heizleistung des verwendeten Gerätes bestimmt wird, werden die unteren 2 bis 3 mm (> 50 % < 80 %) des Rohling/Stanzzylinder-Ensembles durchgeschmolzen, ohne daß dabei der gesamte Block durchschmilzt. Der Multi-Block wird dann schnell auf 20°C abgekühlt und auf einem gut wärmeleitenden Material (Kupferplatte, Heizblock oder PCR-Maschine) gelagert. Durch die langsame Erhitzung wird erreicht, daß auch das Paraffin in den Gewebestanzzylindern sich mitverflüssigt, und so eine innige Verbindung zwischen dem Paraffin der Gewebestanzzylinder und dem unteren Teil des Paraffinrohlings beim Wiedererkalten gelingt. Dieser Schritt zusammen mit dem anschließend geschilderten zweiten Schmelzvorgang mit Oberhitze ist entscheidend für die Herstellung eines homogenen Multi-Blocks, der am Ende wie jeder normale Standard-Paraffinblock weiterverarbeitet werden kann.

Nach dem vollständigen Erkalten folgt der in Fig. 4d dargestellte zweite Teil des Doppel-Schmelz-Verfahrens, bei dem über Oberhitze (H2) analog zum vorher Gesagten erneut eine hitzebedingte Verflüssigung, jetzt aber des oberen Anteils des Paraffinrohlings mit eingesteckten Gewebestanzzylindern durchgeführt wird. Dabei wird der Multi-Block von oben mit Hilfe einer weiteren Wärmequelle (vorzugsweise einer Infrarot-Heizlampe) solange bestrahlt, bis der Multi-Block von oben geschmolzen ist, wiederum jedoch ohne den Multi-Block vollständig durchzuschmelzen. Eine gute Wärmeableitung im unteren Teil des Blockes ist für diesen Schritt Voraussetzung.

Auf das an der Oberfläche verflüssigte Paraffin wird gemäß Fig. 5a jetzt eine handelsübliche Einbettkassette aus Kunststoff (I), wie sie in der täglichen Routine zur Herstellung von Paraffinblöcken eingesetzt wird, aufgesetzt. Nun wird erneut vorerhitztes Paraffin (D), beispielsweise bei 65°C, ein-

gefüllt, bis die verbliebenen Hohlräume vollständig mit Paraffin gefüllt sind und das Paraffin auch den Boden der Einbettkassette I vollständig bedeckt. Der auf diese Weise hergestellte Multi-Block wird anschließend auf Zimmertemperatur abgekühlt (ca. 4 h) und anschließend die fest eingegossene Einbettkassette durch Beklopfen aus der Einbettschale herausgelöst, wie in Fig. 5c dargestellt ist.

Ein fertiggestellter Paraffinblock ist in den Fig. 6a, b in einer Seitenansicht und einer Ansicht von unten dargestellt, wobei mit K eine Gewebeprobe aus artfremdem Gewebe oder Kunststoff zu Orientierungszwecken bezeichnet ist. Von einem derartigen Paraffinblock können in an sich bekannter Weise, beispielsweise mittels eines Mikrotoms oder dergleichen, von der unteren Hauptoberfläche des Blockes Gewebeschnitte abgeschnitten werden, die für die Mikroskopie in einer Dicke von 2-5 μm angefertigt werden können und auf einem Objektträger, wie einem Glasträger, befestigt werden können. Um eine eindeutige Orientierung aller in den Multi-Block eingebrachten Gewebestanzzyylinder zu gewährleisten, besteht einer der Gewebestanzzyylinder aus artfremdem Gewebe bzw. aus leicht schneidbarem Kunststoff (K). Dieser Markierungszyylinder ist in asymmetrischer Position einzubringen, um auch bei Verdrehungen bzw. spiegelbildlichem Aufziehen (von der Rückseite) auf einen Objektträger jederzeit eine eindeutige, positive Identifizierungs- und Orientierungsmöglichkeit zu behalten.

Durch das weiter oben beschriebene sequentielle Doppelschmelzen des Multi-Blockes von zwei Seiten unter Verzicht auf das vollständige Durchschmelzen wird eine konstante Anordnung der Gewebestanzzyylinder im Multi-Block garantiert. Alle Bereiche des Blockes werden dennoch sequentiell vollständig geschmolzen. Dieses Verfahren ermöglicht den Gewebeproben, sich innig mit dem Paraffin der Umgebung des neuen

Multi-Blockes zu verbinden und vermeidet somit das Herausfallen einzelner Zylinderscheiben bzw. das sogenannte Auseinanderschwimmen auf dem Wasserbad bei der Herstellung von Gewebeschnitten. Da sich dieser Block von Paraffinblöcken mit nur
5 einer Gewebeprobe technisch nicht mehr unterscheidet, kann er wie diese weiterverarbeitet werden und auf besondere Hilfsmittel verzichtet werden.

Das beschriebene Verfahren kann auf vielfältige Weise verändert und modifiziert werden. Beispielsweise kann als Material
10 für den Materialrohling anstelle von Paraffin ein anderes geeignetes, fließfähiges und härtbares Material, wie beispielsweise ein geeignetes Epoxidharz oder dergleichen, verwendet werden. Ferner kann vorgesehen sein, daß die für das Einbringen der Gewebeproben vorgesehenen Öffnungen in dem Material-
15 rohling nicht als Durchgangsöffnungen ausgebildet sind, sondern in einer bestimmten Tiefe des Materialrohlings enden, wobei eine andere hierfür geeignete Gußform verwendet werden muß. Dies bedeutet, daß nach Fertigstellung des Material-
20 blocks mit den multiplen Gewebeproben eine bestimmte Dicke abgetragen werden muß, bevor Gewebeschnitte mit multiplen Gewebeproben abgeschnitten werden können.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines Materialrohrlings enthal-
5 tend eine Mehrzahl von Öffnungen für die Aufnahme von zu
untersuchenden Proben, bei welchem
- mittels einer geeignet ausgebildeten Gußform ein Mate-
rialrohling mit einer regelmäßigen Anordnung von Öffnun-
10 gen geformt wird, die sich ausgehend von einer ersten
Hauptoberfläche des Materialrohrlings in Richtung auf ei-
ne zweite Hauptoberfläche des Materialrohrlings bis in
eine bestimmte Tiefe erstrecken.
2. Verfahren zur Herstellung eines Materialblocks enthal-
15 tend eine Mehrzahl von zu untersuchenden Proben, bei welchem
a) ein Materialrohling gemäß Anspruch 1 hergestellt wird
und
b) in mindestens einen Teil der vorhandenen Öffnungen des
Materialrohrlings zu untersuchenden Proben eingebracht
20 und mit dem umgebenden Material des Materialrohrlings
fest verbunden werden.
3. Verfahren zur Herstellung dünner Probenschnitte enthal-
tend eine Mehrzahl von zu untersuchenden Proben, bei
25 welchem
- nach der Herstellung eines Materialblocks gemäß Anspruch
2 von einer seiner Hauptoberflächen, an der die in ihn
eingebrachten zu untersuchenden Proben nach außen frei-
gelegt sind, Probenschnitte, vorzugsweise in einer Dicke
30 von 2-5 μm und insbesondere unter Verwendung eines Mi-
krotoms, abgeschnitten werden.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch g e k e n n z e i c h n e t, daß
35 - die Öffnungen als Durchgangsöffnungen ausgebildet wer-
den.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß

- die Gußform ein insbesondere aus Aluminium gefertigtes Substrat aufweist, von dessen einer Hauptoberfläche eine der zu formenden Anordnung von Öffnungen des Materialrohrlings entsprechende regelmäßige Anordnung zapfenförmiger Elemente wegragt,
- das Material des zu formenden Materialrohrlings in fließfähiger Form auf die Hauptoberfläche des Substrats aufgebracht und ausgehärtet wird, und
- der Materialrohling von dem Substrat entfernt wird.

6. Verfahren nach Anspruch 5,

dadurch gekennzeichnet, daß

- eine erste Einbettschale, die in ihrer Bodenfläche eine der Anordnung zapfenförmiger Elemente entsprechende Anordnung Löcher aufweist, vor dem Aufbringen des Materials des zu formenden Materialrohrlings derart auf die Hauptoberfläche des Substrats aufgebracht wird, daß die zapfenförmigen Elemente durch die Löcher hindurchtreten und die Bodenfläche schlüssig auf der Hauptoberfläche zu liegen kommt,
- die erste Einbettschale nach dem Aushärten des Materials mit diesem von der Gußform abgehoben wird, und
- anschließend von dem geformten Materialrohling entfernt wird.

7. Verfahren nach Anspruch 2,

dadurch gekennzeichnet, daß

- die zu untersuchenden Proben insbesondere stab- oder zylinderförmig sind und durch Ausstanzen aus Probenblöcken gewonnen werden, in denen das Gewebe in ein Einbettungsmaterial, wie Paraffin, eingebettet ist.

8. Verfahren nach Anspruch 2 oder 7,

dadurch gekennzeichnet, daß

- vor dem Einbringen der zu untersuchenden Proben in die Öffnungen des Materialrohrlings dieser, falls die Öffnun-

gen Durchgangsöffnungen sind, in eine zweite Einbettschale eingesetzt wird, und

- anschließend die zu untersuchenden Proben in die Durchgangsöffnungen auf der der zweiten Einbettschale abgewandten Hauptoberfläche des Materialrohrlings eingeschoben werden, bis sie auf der gegenüberliegenden Seite der Durchgangsöffnung an die Bodenfläche der zweiten Einbettschale anstoßen.

10 9. Verfahren nach Anspruch 2,

dadurch gekennzeichnet, daß

- zu Orientierungszwecken eine Gewebeprobe (K) aus artfremdem Gewebe oder aus Kunststoff besteht und innerhalb der regelmäßigen Anordnung in einer asymmetrischen Position eingebracht wird.

10. Verfahren nach Anspruch 2,

dadurch gekennzeichnet, daß

- die in den Materialrohling eingebrachten zu untersuchenden Proben durch mindestens einen Temperaturbehandlungsschritt mit dem sie jeweils umgebenden Material des Materialrohrlings verbunden bzw. verschmolzen werden.

11. Verfahren nach Anspruch 10,

25 dadurch gekennzeichnet, daß

- die zu untersuchenden Proben durch zwei Temperaturbehandlungsschritte, bei denen jeweils auf einer Seite des Materialrohrlings Wärme zugeführt wird, mit dem sie jeweils umgebenden Material des Materialrohrlings verbunden bzw. verschmolzen werden.

12. Verfahren nach Anspruch 2 oder 8,

dadurch gekennzeichnet, daß

- auf der Seite der Oberfläche des Materialrohrlings, von der die zu untersuchenden Proben eingebracht wurden, eine Einbettkassette derart angebracht wird, daß ihr Boden einen Abstand von der Oberfläche des Materialrohrlings einhält,

- ein fließfähiges, härtbare Material, insbesondere dasselbe Material wie das des Materialrohrlings, in die Einbettkassette eingefüllt wird, bis verbliebene Hohlräume vollständig mit dem Material gefüllt werden und das Material den Boden der Einbettkassette bedeckt, und
- eine gegebenenfalls noch auf der gegenüberliegenden Seite vorhandene zweite Einbettschale entfernt wird.

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß

- das Material des Materialrohrlings Paraffin ist.

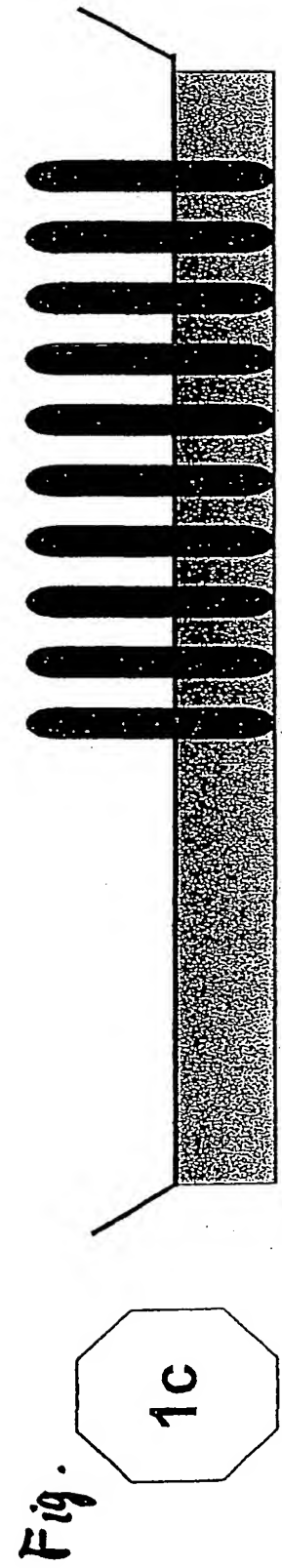
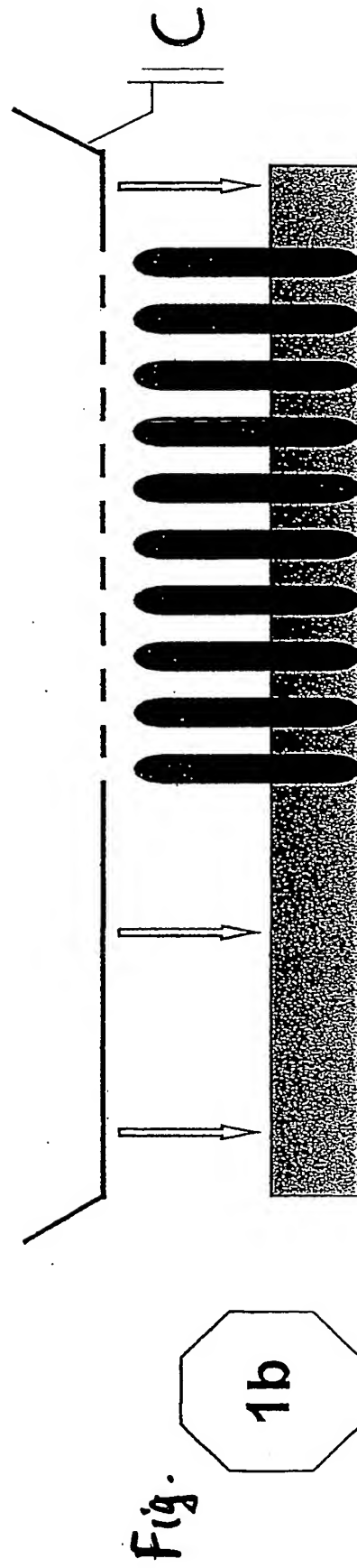
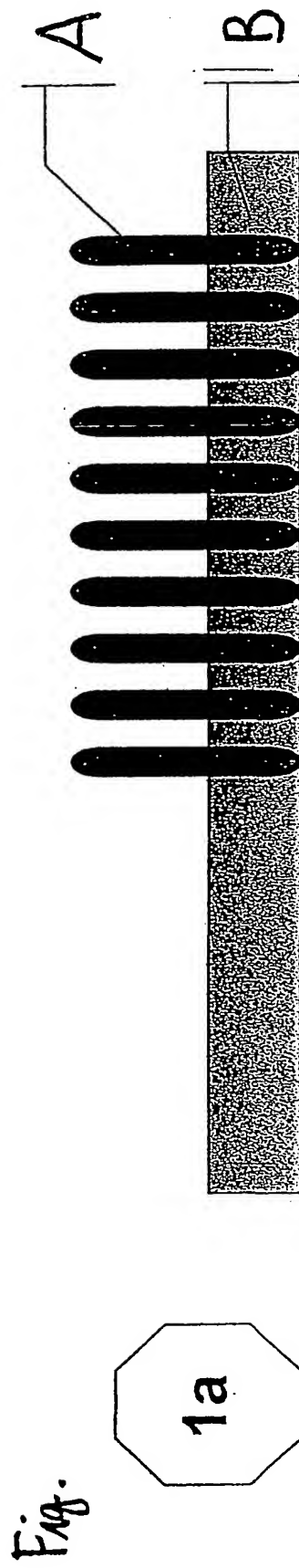
14. Materialrohling mit einer regelmäßigen Anordnung von Öffnungen für die Aufnahme von zu untersuchenden Proben, die sich ausgehend von einer ersten Hauptoberfläche des Materialrohrlings in Richtung auf eine zweite Hauptoberfläche des Materialrohrlings erstrecken.

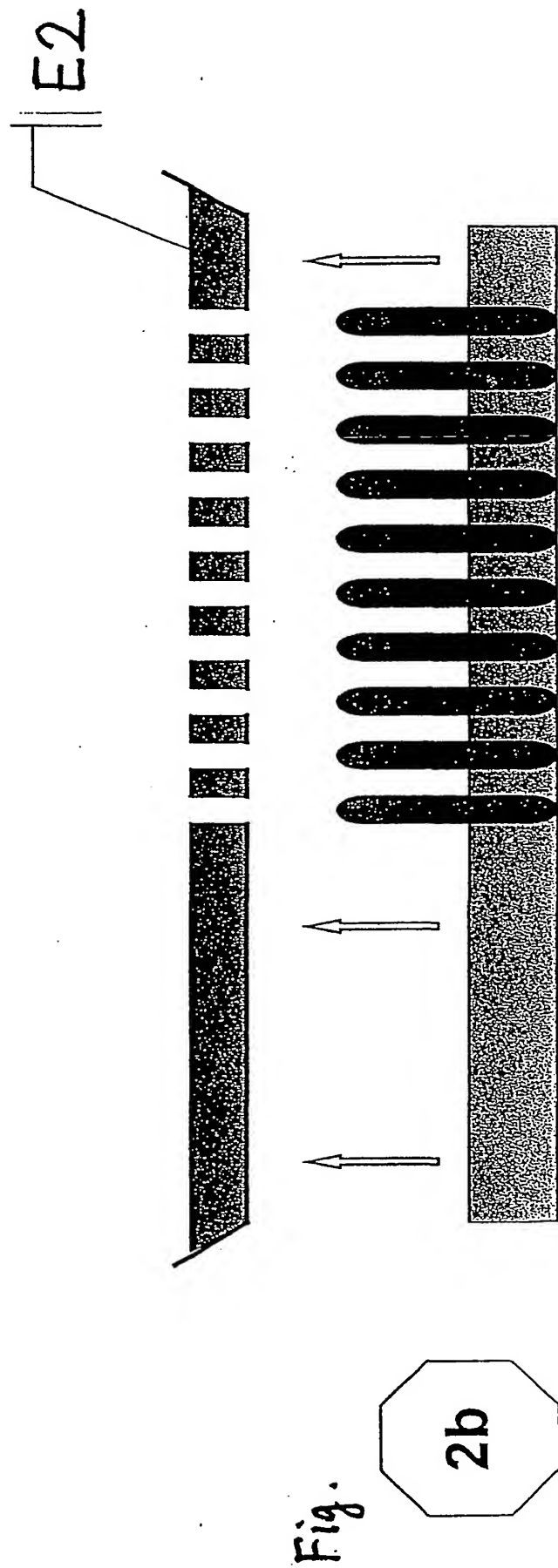
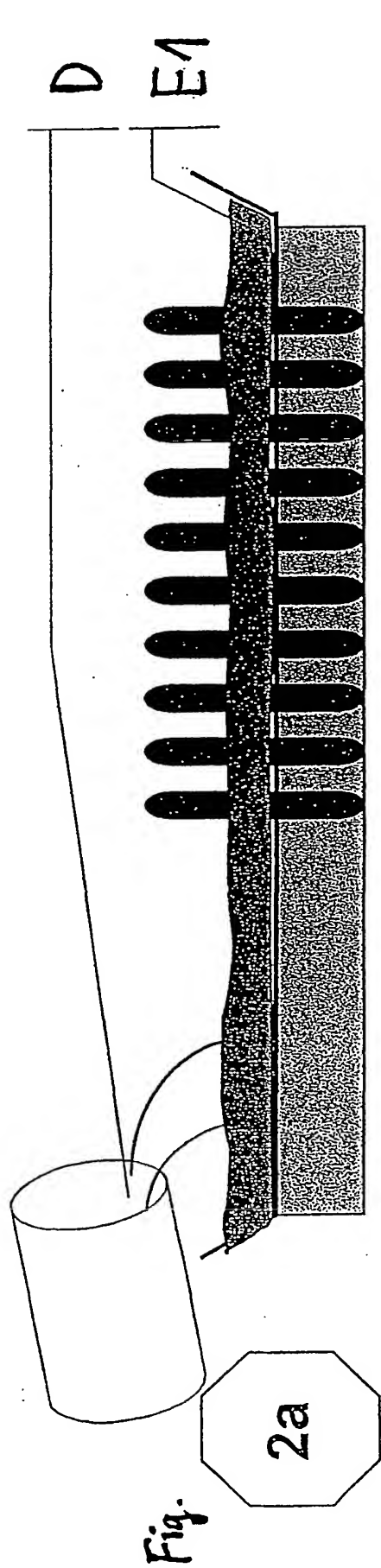
15. Materialrohling nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß

- die Öffnungen als Durchgangsöffnungen ausgebildet sind.

16. Materialrohling nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß

- er aus Paraffin hergestellt ist.





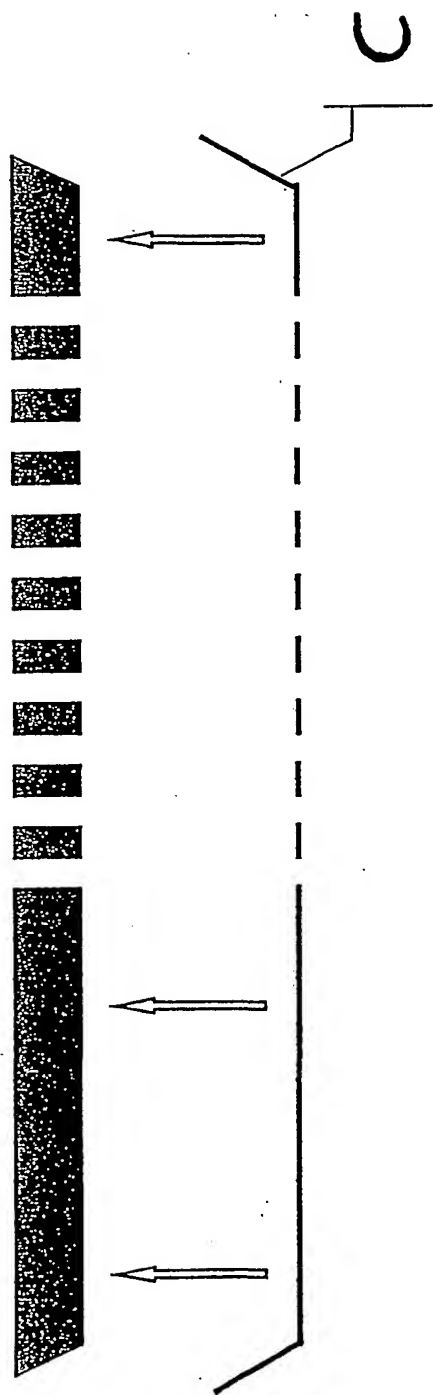


Fig. 3a

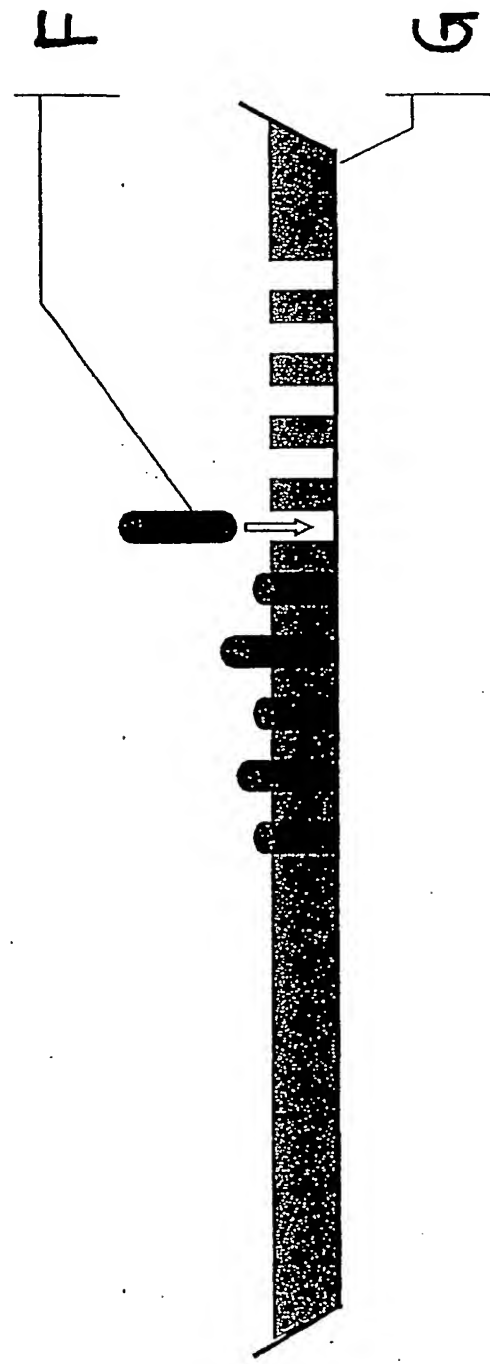
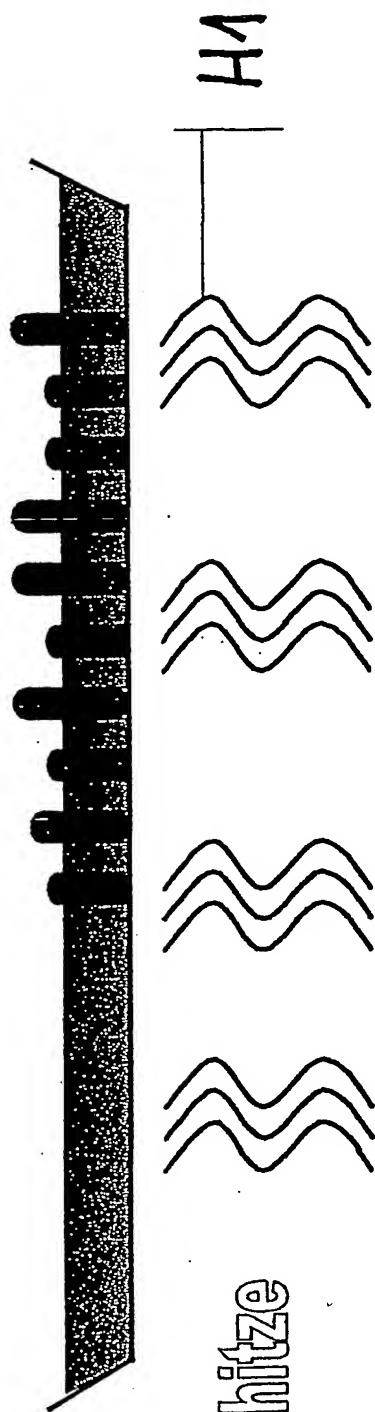


Fig. 3b

Fig.

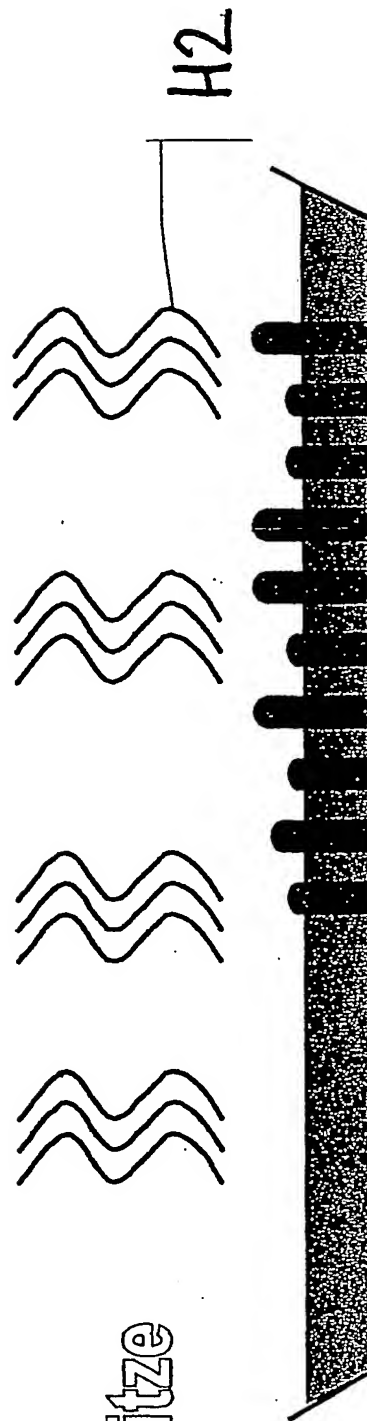
4a

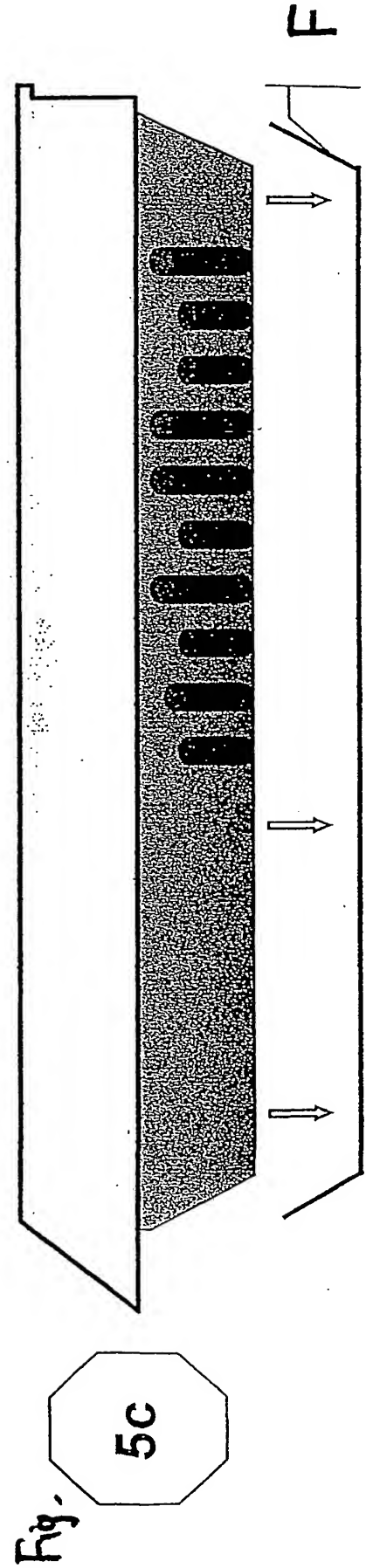
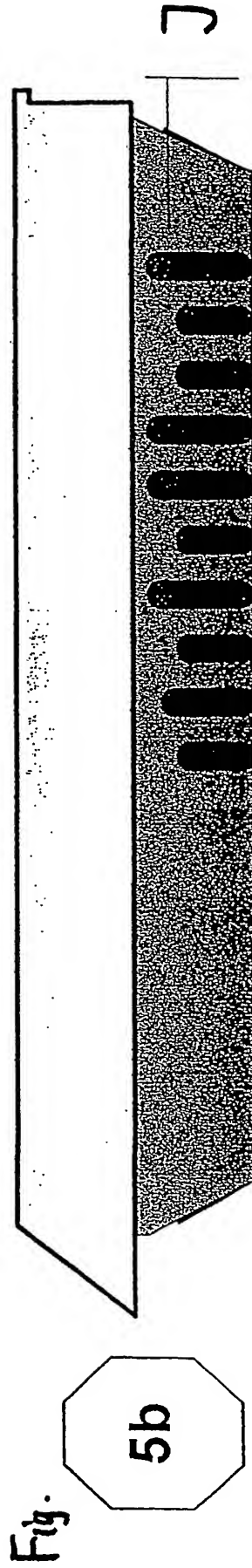
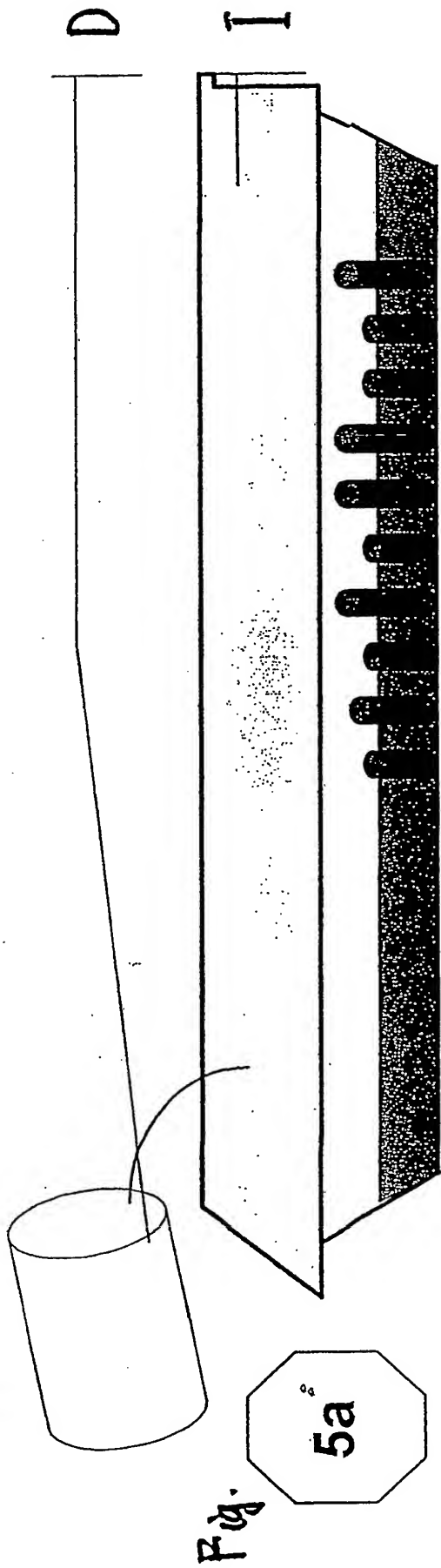
A = Unterhitze

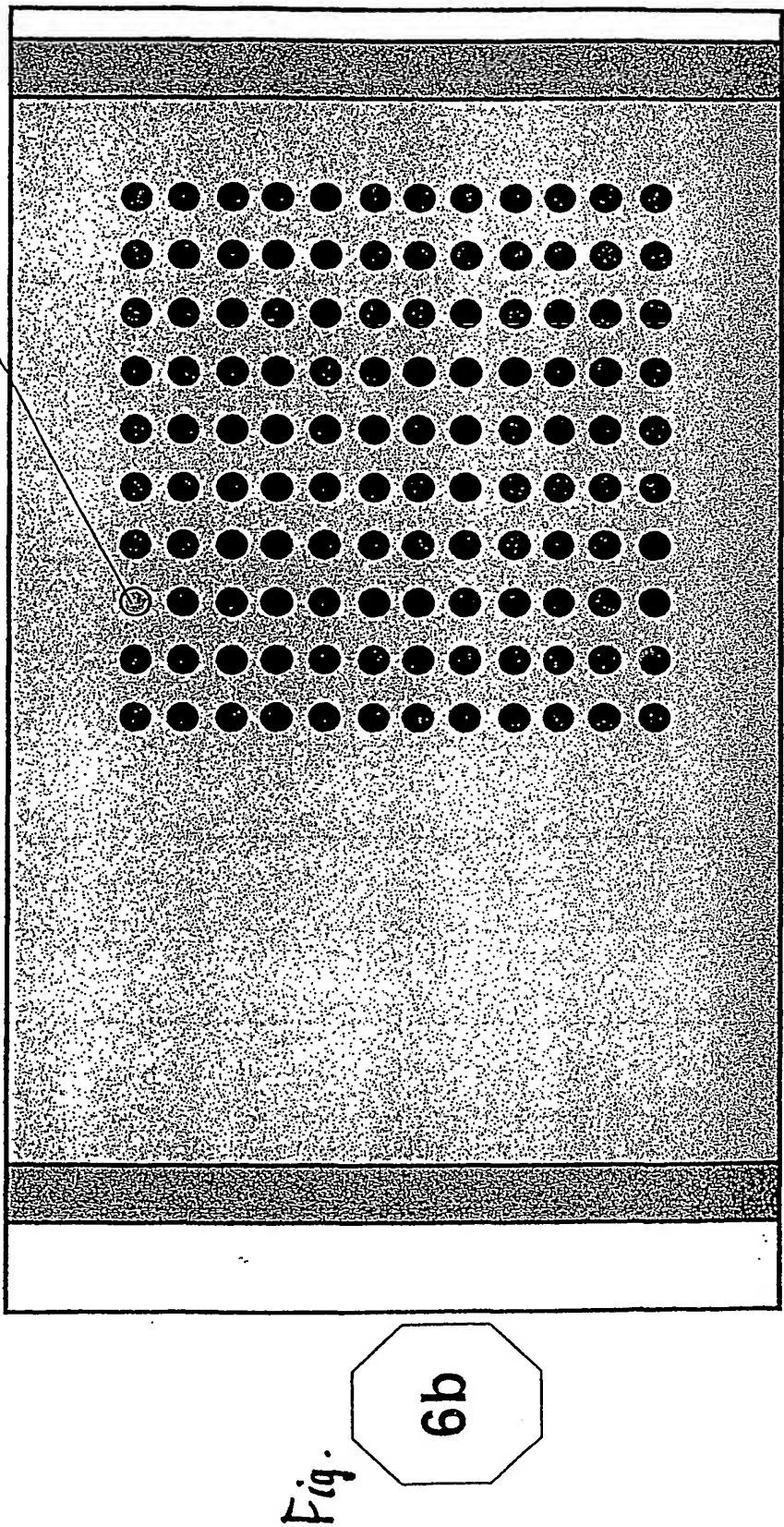
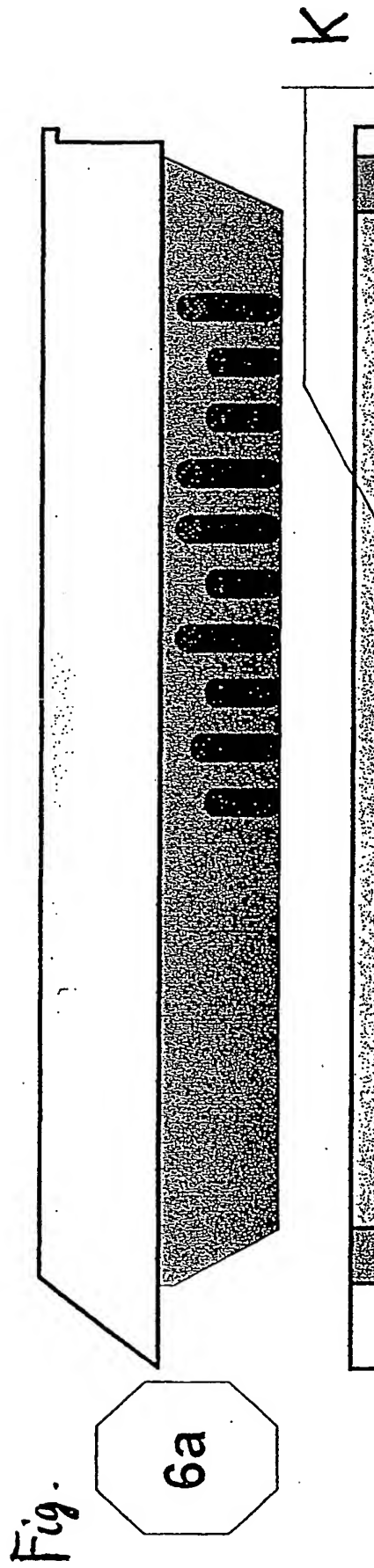


B = Oberhitze

4b







INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern Application No

PCT/DE 00/04647

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N1/36

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N B29C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2 667 938 A (ELF AQUITAINE) 17 April 1992 (1992-04-17) page 5, line 24-36; figures 1-3,5	1,2,14, 15
Y A	---	7,10,16 4-6
X	EP 0 142 574 A (GISE HARDO DR FREIHERR VON) 29 May 1985 (1985-05-29) abstract; claim 1; figure 1	14
Y A	---	16 13
Y	US 4 914 022 A (FURMANSKI PHILIP ET AL) 3 April 1990 (1990-04-03) cited in the application column 1, line 60-68 ---	7
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 May 2001

Date of mailing of the international search report

31/05/2001

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Brison, O

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Inter # Application No
 PCT/DE 00/04647

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4 443 395 A (MOTTA VALERIO) 17 April 1984 (1984-04-17) column 1, line 60-65; claim 1; figure 1	14
Y	----	10
X	GB 2 144 366 A (PARKE DAVIS & CO) 6 March 1985 (1985-03-06) abstract; figure 4	14
A	----- KONONEN ET AL: "Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumour specimens" NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING, CO, US, vol. 4, no. 7, July 1998 (1998-07), pages 844-847, XP002160224 ISSN: 1078-8956 cited in the application figure 1	1,7
A	----- FR 2 502 539 A (SEB SA) 1 October 1982 (1982-10-01) claim 1; figures 1,2	14,15
X	----- DE 29 24 928 A (LKB PRODUKTER AB) 3 January 1980 (1980-01-03) the whole document	14
A	----- US 5 002 377 A (BATTIFORA HECTOR A ET AL) 26 March 1991 (1991-03-26) cited in the application column 3, line 12-21 -----	1,3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 00/04647

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2667938 A	17-04-1992	NONE	
EP 0142574 A	29-05-1985	NONE	
US 4914022 A	03-04-1990	NONE	
US 4443395 A	17-04-1984	IT 1058687 B DE 2713717 A FR 2346708 A GB 1566500 A	10-05-1982 06-10-1977 28-10-1977 30-04-1980
GB 2144366 A	06-03-1985	NONE	
FR 2502539 A	01-10-1982	NONE	
DE 2924928 A	03-01-1980	FR 2429420 A GB 2023489 A, B JP 55013899 A SE 7807073 A US 4272049 A	18-01-1980 03-01-1980 31-01-1980 22-12-1979 09-06-1981
US 5002377 A	26-03-1991	AU 653283 B AU 3045392 A AU 646984 B AU 3045492 A AU 629838 B AU 3789089 A CA 1322539 A DE 68919136 D DE 68919136 T EP 0350189 A JP 2161334 A JP 3055907 B	22-09-1994 11-03-1993 10-03-1994 08-04-1993 15-10-1992 11-01-1990 28-09-1993 08-12-1994 24-05-1995 10-01-1990 21-06-1990 26-06-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern des Aktenzeichens

PCT/DE 00/04647

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N1/36

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N B29C

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	FR 2 667 938 A (ELF AQUITAINE) 17. April 1992 (1992-04-17) Seite 5, Zeile 24-36; Abbildungen 1-3,5	1,2,14, 15
Y		7,10,16
A		4-6
X	EP 0 142 574 A (GISE HARDO DR FREIHERR VON) 29. Mai 1985 (1985-05-29) Zusammenfassung; Anspruch 1; Abbildung 1	14
Y		16
A		13
Y	US 4 914 022 A (FURMANSKI PHILIP ET AL) 3. April 1990 (1990-04-03) in der Anmeldung erwähnt Spalte 1, Zeile 60-68	7
	-/--	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

23. Mai 2001

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

31/05/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Brison, O

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern: ales Aktenzeichen

PCT/DE 00/04647

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 4 443 395 A (MOTTA VALERIO) 17. April 1984 (1984-04-17) Spalte 1, Zeile 60-65; Anspruch 1; Abbildung 1	14
Y	----	10
X	GB 2 144 366 A (PARKE DAVIS & CO) 6. März 1985 (1985-03-06) Zusammenfassung; Abbildung 4	14
A	----- KONONEN ET AL: "Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumour specimens" NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING, CO, US, Bd. 4, Nr. 7, Juli 1998 (1998-07), Seiten 844-847, XP002160224 ISSN: 1078-8956 in der Anmeldung erwähnt Abbildung 1	1,7
A	----- FR 2 502 539 A (SEB SA) 1. Oktober 1982 (1982-10-01) Anspruch 1; Abbildungen 1,2	14,15
X	----- DE 29 24 928 A (LKB PRODUKTER AB) 3. Januar 1980 (1980-01-03) das ganze Dokument	14
A	----- US 5 002 377 A (BATTIFORA HECTOR A ET AL) 26. März 1991 (1991-03-26) in der Anmeldung erwähnt Spalte 3, Zeile 12-21 -----	1,3

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internat. Aktenzeichen
PCT/DE 00/04647

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
FR 2667938 A	17-04-1992	KEINE	
EP 0142574 A	29-05-1985	KEINE	
US 4914022 A	03-04-1990	KEINE	
US 4443395 A	17-04-1984	IT 1058687 B DE 2713717 A FR 2346708 A GB 1566500 A	10-05-1982 06-10-1977 28-10-1977 30-04-1980
GB 2144366 A	06-03-1985	KEINE	
FR 2502539 A	01-10-1982	KEINE	
DE 2924928 A	03-01-1980	FR 2429420 A GB 2023489 A, B JP 55013899 A SE 7807073 A US 4272049 A	18-01-1980 03-01-1980 31-01-1980 22-12-1979 09-06-1981
US 5002377 A	26-03-1991	AU 653283 B AU 3045392 A AU 646984 B AU 3045492 A AU 629838 B AU 3789089 A CA 1322539 A DE 68919136 D DE 68919136 T EP 0350189 A JP 2161334 A JP 3055907 B	22-09-1994 11-03-1993 10-03-1994 08-04-1993 15-10-1992 11-01-1990 28-09-1993 08-12-1994 24-05-1995 10-01-1990 21-06-1990 26-06-2000

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.